

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian bioremediasi logam berat timbal (Pb) dalam lumpur Lapindo menggunakan campuran bakteri (*Pseudomonas aeruginosa* dan *Pseudomonas pseudomallei*) ini adalah penelitian eksperimental faktorial. Rancangan penelitian yang digunakan adalah deskriptif kuantitatif. Hasil penelitian berupa deskripsi yang ditunjukkan dengan angka-angka kuantitatif sebagai penguat hasil penelitian.

Campuran bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah *Pseudomonas pseudomallei* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Penelitian ini menggunakan campuran bakteri dengan berbagai konsentrasi yaitu 0%, 9%, 12% dan 15%. Percobaan bioremediasi dilakukan dengan waktu inkubasi 40 hari, dimana setiap 20, 30, dan 40 hari dilakukan analisa kadar logam timbal (Pb) dan juga perhitungan total jumlah sel mikroba.

3.2 Variabel Penelitian

Penelitian ini menggunakan tiga variabel yaitu :

- 1) Variabel bebas, *independent variable* yaitu variabel yang dianggap menjadi penyebab bagi terjadinya perubahan pada variabel terikat. Pada penelitian eksperimen, variabel bebas adalah variabel yang dimanipulasi. Berdasarkan hal tersebut maka variabel bebas dalam penelitian ini adalah campuran bakteri dengan konsentrasi 0%, 9%, 12%, dan 15% dan lama inkubasi.

- 2) Variabel terikat, *dependent variable* yaitu variabel yang dipengaruhi oleh variabel bebas, yang dalam eksperimen perubahannya diukur untuk mengetahui efek dari suatu perlakuan. Variabel terikat yang digunakan adalah kadar logam berat timbal (Pb), dan jumlah total sel yang diukur menggunakan metode TPC (Total Plate Count).
- 3) Variabel terkontrol yaitu variabel yang diusahakan sama untuk setiap perlakuan. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah air lumpur Lapindo yang mengandung logam timbal (Pb).

3.3 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai Juli 2014 di laboratorium fisiologi tumbuhan, laboratorium mikrobiologi jurusan Biologi dan laboratorium instrumentasi jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah tabung reaksi, erlenmeyer, cawan petri, bunsen, LAF, inkubator, *Slurry* bioreaktor bioremediasi skala laboratorium, mikropipet, shaker inkubator, bluetipe, hotplate, autoklaf, ose, inkubator, gelas ukur, termometer, pH meter, spektrofotometer, stirer, kuvet, beaker glass dan seperangkat alat uji SSA.

3.4.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini diantaranya adalah media Nutrien Broth (NB), media Nutrien Agar (NA), aquabides, aquades, kapas, kasa, alkohol, air sampel lumpur Lapindo, inokulan bakteri (*Pseudomonas*

pseudomallei dan *Pseudomonas aeruginosa*), kertas label, plastik wrap, plastik sterilisasi, alat tulis dan tissue.

3.5 Kegiatan Penelitian

3.5.1 Pembuatan Media

Media yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam beaker glass, kemudian ditambahkan aquades sampai 1liter, dipanaskan di atas hotplate sampai mendidih dan dihomogenkan menggunakan stirer. Setelah homogen media di tuang ke dalam erlenmeyer, ditutup dengan kapas yang dibungkus kasa kemudian disterilisasi.

3.5.2 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sebelum melaksanakan penelitian, semua alat dan bahan harus disterilisasi terlebih dahulu. Alat-alat yang terbuat dari gelas dibungkus dengan plastik yang tahan panas kemudian diikat dengan rapat agar air atau bakteri yang berada di sekitarnya tidak masuk, kecuali cawan petri harus dibungkus kertas terlebih dahulu baru kemudian dimasukkan ke dalam plastik. Bahan atau media yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri setelah direbus sampai mendidih diatas hotplate kemudian dimasukkan erlenmeyer ditutup kapas dan dimasukkan kedalam plastik tahan panas. Setelah itu bahan yang telah dibungkus tersebut dimasukan dalam autoklaf untuk disterilisasi selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm.

3.6.1 Pembuatan Kurva Standar Logam Timbal (Pb)

Kurva standar logam timbal Pb yang digunakan sebagai standar analisa logam. Kurva standar logam timbal (Pb) dibuat dari larutan standar logam timbal (Pb) 1000ppm. Larutan kemudian dibuat stok 10 ppm sebanyak 250 ml. Pembuatan larutan stok melalui rumus pengenceran (Mulyono, 2006):

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

Keterangan :

M_1 = molaritas larutan sebelum diencerkan (M)

M_2 = molaritas setelah pengenceran (M)

V_1 = volume larutan sebelum diencerkan (ml)

V_2 = volume larutan setelah pengenceran (ml)

Berdasarkan perhitungan tersebut kemudian diperoleh larutan Pb yang harus diambil dari larutan stok sebesar 2,5 ml. Kemudian larutan diencerkan dengan menggunakan HNO_3 0,5 M hingga mencapai volume total 250 ml. Larutan kemudian digunakan untuk membuat kurva standar Pb dalam AAS dengan konsentrasi 1, 2, 4, dan 5 ppm (lampiran 1).

3.6.2 Pengukuran Kadar Logam Timbal (Pb)

Pengukuran kadar logam berat timbal (Pb) dilakukan menggunakan metode AAS. Langkah-langkah preparasi sampel adalah sebagai berikut (SNI 2000):

- 1) Ditimbang 5 gr sampel
- 2) Dimasukkan kedalam Erlenmeyer 100 ml
- 3) Ditambahkan akuades sebanyak 40 ml dikocok
- 4) Ditambahkan 10 ml asam nitrat pekat 65% dan dikocok
- 5) Didestruksi dan dipanaskan menggunakan hotplate hingga sisa volume separuh dari volume awal
- 6) Disaring menggunakan kertas saring
- 7) Dianalisis filtrat dengan AAS pada panjang gelombang 270 nm

3.6.3 Peremajaan dan Pembuatan Starter Campuran Bakteri (*Pseudomonas pseudomallei* dan *Pseudomonas aeruginosa*)

Peremajaan isolat bakteri *Pseudomonas pseudomallei* dan *Pseudomonas aeruginosa* dilakukan pada media padat miring yaitu *Nutrien Agar* (NA). Diambil 1 ose bakteri dari stok atau koleksi, kemudian distreak pada media NA miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.6.4 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri

- a) Pembuatan inokulum campuran bakteri (*Pseudomonas pseudomallei* dan *Pseudomonas aeruginosa*)

Sebelum melakukan kultur bakteri, terlebih dahulu tahapan yang harus dilakukan adalah pembuatan inokulum untuk menghomologkan usia bakteri. Cara membuat inokulum yaitu dengan mengambil masing-masing 1 ose bakteri (*Pseudomonas pseudomallei* dan *Pseudomonas aeruginosa*) dari regenerasi kemudian diinokulasikan pada 50 mL media NB hasil preparasi, selanjutnya diinkubasi dalam shaker inkubator dengan kecepatan 125 rpm dan temperatur 37°C selama 24 jam untuk memperoleh pertumbuhan bakteri pada fase eksponensial, inokulum tersebut selanjutnya digunakan untuk starter pada pembuatan kurva pertumbuhan.

- b) Pembuatan Kurva Standart campuran bakteri (*Pseudomonas pseudomallei* dan *Pseudomonas aeruginosa*)

Hasil inokulum mikroba eksogen (*Pseudomonas pseudomallei* dan *Pseudomonas aeruginosa*) yang telah diinkubasi pada shaker inkubator dengan kecepatan 125 rpm pada suhu 37°C dilakukan pengenceran 1/2 sampai 1/16. Disiapkan 5 botol flacon, masing-masing botol flacon diisi dengan 6 ml media NB. Tabung pertama diisi dengan inokulum sebanyak 12 ml dan dihitung sebagai

1/2. Tabung kedua yang berisi media NB steril ditambahkan 6 ml inokulum dihitung sebagai 1/4. Tabung ketiga pada botol flacon yang berisi 6 ml media NB steril ditambahkan dengan 6 ml dari pengenceran sebelumnya dan dihitung sebagai 1/8, begitu seterusnya hingga 1/16. Kemudian masing-masing pengenceran diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 610 nm. Diambil 1 mL pengenceran dituang ke dalam 9 mL media NB dan dilakukan pengenceran sampai 10^{-10} . Kemudian dari pengenceran 10^{-5} sampai 10^{-10} diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan dalam cawan petri. Kemudian ditambahkan 10 mL media NA, lalu cawan petri digoyang-goyang supaya NA merata, dibiarkan beberapa menit sampai membeku. Lalu cawan petri disimpan dalam posisi terbalik di dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.

Hasil dari kurva standar bakteri nantinya akan didapatkan persamaan dari regresi yaitu $Y = ax + b$. Regresi linear sederhana menggunakan persamaan $Y = aX + b$. Dimana (Awwalurizki dan Surya, 2008);

- (b) merupakan koefisien regresi
- (a) merupakan tetapan regresi
- (Y) nilai TPC dan (X) nilai OD
- c) Inkubasi selama 24 jam

Setelah diperoleh inokulum campuran bakteri (*Pseudomonas pseudomallei* dan *Pseudomonas aeruginosa*), selanjutnya untuk membuat kurva pertumbuhan harus dilakukan inkubasi bakteri dalam media selama 48 jam, dimana setiap 2 jam sekali (waktu inkubasi 0, 2, 4, 6, 8, 9, 15, 18, 20, 22 dan 24 jam dan seterusnya) dilakukan uji kekeruhan. Pembuatan kurva pertumbuhan dapat dilakukan dengan

menginokulasi 10% inokulum dalam erlenmeyer 100 mL yang berisi media bercampur lumpur. Setelah dilakukan proses inokulasi, dilakukan inkubasi selama 48 jam dalam shaker inkubator dengan kecepatan 125 rpm dan temperatur 37°C (Ciccyliona, 2012).

3.6.5 Persiapan Reaktor Bioremediasi

Penelitian skala laboratorium pada *Slurry* bioreaktor, dengan menggunakan baskom volume ± 2 liter selama 20 hari, 30 hari dan 40 hari. Kemudian pada reaktor tersebut dimasukkan sampel air lumpur Lapindo dengan perbandingan 1:5 atau 1 kg lumpur dalam 5 liter aquades.



Gambar 3.1 Reaktor bioremediasi

3.6.6 Percobaan Bioremediasi

Percobaan bioremediasi dilakukan dengan menyiapkan sampel air lumpur Lapindo dengan perbandingan 1:5 atau 1 kg lumpur dalam 5 liter aquades dimasukkan kedalam reaktor, kemudian dimasukkan inokulum bakteri. Campuran ini kemudian diinkubasi selama 20 hari, 30 hari dan 40 hari.

3.6.7 Perhitungan % Penurunan Kadar Logam

Penentuan persentase logam berat Pb dengan menghitung daya reduksi (DR) sesuai persamaan (Husain dan Irna, 2005):

$$DR = \frac{C(a) - C(b)}{C(a)} \times 100\%$$

Keterangan :

C(a) = Konsentrasi awal Pb (ppm)

C(b) = Konsentrasi akhir Pb (ppm)

DR = Daya reduksi

3.6.8 Perhitungan Jumlah Total Sel Mikroba

Pertumbuhan mikroba dalam proses biodegradasi lumpur diamati berdasarkan populasi mikroba menggunakan metode angka lempeng total (*Total Plate Count*). Sampel lumpur yang telah diberi perlakuan diambil 1 ml kemudian dilakukan pengenceran hingga 10^{-10} . Mulai pengenceran 10^{-6} sampai 10^{-10} kemudian di tanam pada media NA (Syafrizal, 2010).

3.7 Pengumpulan dan Analisa Data

Data penurunan kadar logam berat timbal (Pb) dalam lumpur Lapindo diukur menggunakan SSA. Kadar logam diukur setiap 20 hari pertama, 30 hari kedua dan 40 hari terakhir. Setiap 20, 30 dan 40 hari selain diukur kadar logamnya, juga dihitung jumlah total sel menggunakan metode TPC (*Total Plate Count*). Data yang diperoleh bersifat deskriptif dengan angka-angka kuantitatif. Analisis deskriptif kuantitatif disajikan dengan cara mendeskripsikan atau

menggambarkan data yang telah terkumpul dan diinterpretasikan menggunakan tabel dan grafik.

